

中和モノクローナル抗体を用いたヒトロタウイルスの抗原構造の解析

森 田 泰 行

札幌医科大学小児科学講座 (主任 中尾 亨 教授)

谷 口 孝 喜

札幌医科大学衛生学講座 (主任 浦沢正三 教授)

Analysis of Antigenic Structure of Human Rotaviruses by the Use of Neutralizing Monoclonal Antibodies

Yasuyuki MORITA

Department of Pediatrics, Sapporo Medical College

(Chief : Prof. T. Nakao)

Koki TANIGUCHI

Department of Hygiene, Sapporo Medical College

(Chief : Prof. S. Urasawa)

By employing 4 human rotavirus (HRV) strains, all having a different serotype specificity, we established 22 hybridomas secreting neutralizing monoclonal antibodies (N-mAbs). Reactivity patterns of these N-mAbs were examined by both neutralization and enzyme-linked immunosorbent assays using 17 rotavirus strains. Protein specificity of the N-mAbs was determined by immunoprecipitation analysis and the application of genetically reassorted HRV strains. Further, by propagating HRV KU strain in the presence of N-mAb, we prepared antigenic variants resistant to 12 different N-mAbs, and used them for epitope analysis of the HRV KU strain. The results obtained in the present study are summarized as follows:

1. Of the 22 N-mAbs obtained, 15 showed serotype-specific reactivity: 5 were specific to serotype 1, 7 to serotype 2, 2 to serotype 3 and 1 to serotype 4. The remaining 7 N-mAbs exhibited cross-reactive neutralization patterns.

2. Intraserotypic antigenic variations were found among strains belonging to each of the 4 different serotypes. In addition, a marked difference in antigenicity was shown between the serotype 2 strains and the serotype 1, 3 and 4 strains.

3. It was found that while serotype-specific antigens resided on both VP3 and VP7, cross-reactive antigens were located on VP3.

4. VP7 of the serotype 1KU strain was found to have at least 5 operationally distinct serotype-specific neutralization epitopes which constituted a single antigenic site.

5. VP3 of the KU strain was shown to have at least 4 operationally independent cross-reactive neutralization epitopes.

(Received October 30, 1986 and accepted November 26, 1986)

Key words: Rotavirus, Monoclonal antibody, Neutralization antigen

1 結 言

ロタウイルス (Rotavirus; 以下 RV) は、ヒトを含

めた哺乳類及び鳥類に広く分布しており、非細菌性急性胃腸炎の主要な病源ウイルスである^{1,2)}。

感染性を有する RV の完全粒子は二重殻粒子であり、

外殻蛋白のない一重殻粒子には感染性はない。RVの核酸は、11本の分節した2本鎖RNAにより構成されており、各分節RNAはそれぞれ1種の構造あるいは非構造蛋白をコードしている¹²⁾。二重殻粒子の外層をなす外殻蛋白はVP3(分子量約88,000;以下88K)とVP7(37Kの糖蛋白)であり、一重殻粒子を構成する主要な内殻蛋白はVP2(94K)とVP6(42K)である¹²⁾。

ヒト由来のRV(Human rotavirus;以下HRV)の血清学的性状を検討する過程で、異なる抗原性を有するHRVの存在が示唆された^{3,4)}。その後、RVには補体結合反応(CF)、免疫電顕法(IEM)、免疫粘着血球凝集反応(IAHA)及び酵素抗体法(ELISA)によって区別されるsubgroup抗原と、中和反応によって区別されるserotype抗原の2種の抗原系が共存することが明らかとなった⁹⁾。さらにウイルス構造蛋白と分節RNAの対応関係と遺伝子組換え体(reassortant)を用いた研究により、subgroup抗原は分節RNA6によってコードされるVP6に存在し、serotype抗原は分節RNA8あるいは9によってコードされるVP7に存在することが示されている⁶⁻⁹⁾。

非常に困難とされていたHRVの培養細胞における増殖が可能となって以来^{10,11)}、多数のHRV分離株の抗原性が検討された結果、HRVには少なくとも2種のsubgroup(I及びII)と少なくとも4種のserotype(1, 2, 3及び4)が存在することが明らかとなった^{12,13)}。著者らは、HRVの抗原構造を詳細に検討する目的で、培養可能なHRVを免疫原として使用し、多数のモノクローナル抗体を作製しその性状を検討した。その結果、subgroup抗原は分節2あるいは3によってコードされるVP2にも存在する¹⁴⁾こと、serotype抗原は分節RNA4によってコードされるVP3にも存在する¹⁵⁾こと、さらにVP3にはserotype1~4に共通に存在するcross-reactiveな中和抗原が存在する¹⁵⁾ことなどの新知見を得ている。

本研究においては、HRVの中和に關与する2つの構造蛋白VP3及びVP7の抗原構造を解析する目的で、1)すでに得られた10種の中和モノクローナル抗体(neutralizing monoclonal antibody;以下N-mAb)に加え、新たに作り出した12種のN-mAbの、多数のHRV分離株に対する反応パターン及び蛋白特異性を検討するとともに、2)各N-mAb存在下でHRVを培養することで各抗体に抵抗性を獲得した変異株を作製し、これら変異株の抗原性を検討した。

2 実験材料及び方法

2.1 細胞培養

アカゲザル胎児腎細胞由来株化細胞であるMA-104細胞とアフリカミドリザル腎細胞由来株化細胞であるCV-1細胞を用いた。これらの細胞は、Eagle基礎培地(Eagle's MEM)(Nissui)に、0.15%重曹、グルタミン(0.58 mg/ml)、ファンギゾン(2 µg/ml)、1%ウシ胎児血清、5%仔ウシ血清を加えた培養液で培養した。

2.2 ウイルス

得られたN-mAbの性状を調べるため、培養細胞で増殖可能な以下の16株のHRVを使用した:

- 1) KU, K8, S12, Wa株(subgroup II, serotype 1),
- 2) S2, AK-26, P1, DS-1, HN-126株(subgroup I, serotype 2),
- 3) YO, S3, P2, AK-35株(subgroup II, serotype 3),
- 4) Hochi, Hosokawa, ST-3株(subgroup II, serotype 4).

Wa, DS-1, HN-126とST-3はNIH(National Institutes of Health; U. S. A.)のR. G. Wyatt博士より、Hochi株とHosokawa株は農林水産省家畜衛生試験場、稲葉右二博士より供与された。また動物由来のRVとしてSimian rotavirus(SA11; subgroup I, serotype 3)とNebraska calf diarrhea virus(NCDV; subgroup I, serotype 6)を使用した。

ウイルス液にはアセチル化トリプシン(10 µg/ml;以下トリプシン)で前処置したRVをMA-104細胞に接種し、1時間吸着後、トリプシン(1 µg/ml)を含む培養液存在下で1日ないし3日培養後の培養上清を用いた。

2.3 ウイルスの精製

RV感染細胞培養液を3回凍結融解した後、細胞細片を低速遠心で除去し、上清を100,000 gで3時間超遠心した。沈渣を0.15 M NaCl加リン酸緩衝液(PBS)に懸濁し、等量のフルオロカーボンと混和しホモゲナイザーで攪拌後、低速遠心によって分離した水層部分を、再び100,000 gで2時間超遠心を行った。その沈渣を1 mlのPBSに懸濁し、3.1 mlのメトリザマイド(Nyegaard & Co., Oslo, Norway)グラディエント上に重層して100,000 gで18時間超遠心し、生じたウイルスバンドをPBSで24時間透析して、-80℃に保存した。

2.4 ハイブリドーマ細胞の作製

免疫原としては、精製した KU 株 (serotype 1), S2 株 (serotype 2), YO 株 (serotype 3) 及び ST-3 株 (serotype 4) を使用した。

精製ウイルス液 (約 10^6 p.f.u./ml) 0.1 ml を BALB/c マウスに第 1 日目, 第 30 日目, 第 45 日目に腹腔内接種し免疫した。第 48 日目に免疫マウスの脾細胞とマウスの骨髓細胞 P3-X63-Ag8-653 細胞をポリエチレングリコール 1540 を用いて融合した。融合後 20 日ないし 30 日目に、ハイブリドーマ培養上清中の抗 HRV 中和活性を後述する間接蛍光抗体法により検索し、N-mAb 産生の有無を確認した。N-mAb を産生すると判定されたハイブリドーマは、少なくとも 2 回、限界希釈法によりクローニングを行った。最終的にブリストインで前処置した BALB/c マウスに 10^7 個のハイブリドーマを腹腔内接種し、腹水を得た。

各ハイブリドーマの産生する免疫グロブリンのアイソタイプの決定は、マウス IgG, IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b 及び IgG3 に対するウサギ抗血清 (Miles Yeda, Rehovot, Israel) と、ハイブリドーマ培養上清の 25 倍濃縮液を使用し、Ouchterlony 法により行った。

2.5 中和抗体価の測定

中和抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングと中和抗体価の測定には、蛍光フォーカス減少法を採用した。スクリーニングには、ハイブリドーマ培養上清の 5 倍希釈液を、中和抗体価の測定には腹水の 2 倍階段希釈液を、ウイルス液 (スクリーニングには 500~1,000 蛍光フォーカス単位 (ffu)/25 μ l, 中和抗体価測定には 150~200 ffu/25 μ l) と等量混和し、1 時間、37°C で反応後、96 穴マイクロプレート上の MA-104 単層培養細胞に接種した。18~24 時間培養した後、-80°C に冷却したメタノール処理により感染細胞を固定し、37°C で 2 時間風乾した後、抗 HRV ウサギ血清²⁷⁾ の 20 倍希釈液を 25 μ l 加え 1 時間反応させた。さらに、fluorescein isothiocyanate (FITC) (Sigma) で抗ウサギ IgG ヤギ血清 (Cappel Co., U. S. A.) を標識し、その 30 倍希釈液を 25 μ l 加え 1 時間の染色を行い、落射型蛍光顕微鏡 (type BH-RFL, オリンパス) を用いて蛍光フォーカス数を算定した。対照の 60% 以上蛍光フォーカス数の減少がみられた希釈倍数を中和抗体価とした。

2.6 ELISA 法

腹水の希釈には 10mM PBS (pH 7.4) を使い、洗浄と牛血清アルブミン (BSA), 抗 HRV ウサギ血清及びアルカリフォスファターゼ (ALP) 標識抗ウサギ IgG ヤギ血清の希釈には、0.05% Tween 20 加 PBS (PBS-

Tween) を用いた。

10,000 倍希釈した腹水を 100 μ l ずつポリビニル・マイクロプレート (96 穴) の各ウェルに加え、4°C 24 時間静置し、各抗体を吸着させた。その後 2 回洗浄し、200 μ l の 1% BSA で未吸着部を覆った (4°C, 24 時間)。2 回洗浄し 50 μ l の被検材料 (ウイルス感染培養上清) を加え、4°C 24 時間反応させた。10,000 倍希釈の抗 HRV ウサギ血清 50 μ l を加え 37°C 1 時間反応させ、洗浄後 250 倍希釈の ALP 標識抗ウサギ IgG ヤギ血清を 50 μ l 加え 37°C 1 時間反応させた。最後に 0.1 M sodium carbonate buffer solution (pH 9.6) に溶解した 100 μ l の p-nitrophenylphosphoric acid sodium salt solution (1 mg/ml) を加え、各ウェルの OD₄₁₀ 値を micro ELISA reader (Model MTP-12, コロナ電気) にて測定した。同一検体につき 2 ウェルを用いて反応を行い、結果は両ウェルにおける OD₄₁₀ 値を 1,000 倍し、両者の数値の和で表した。300 以上の値を陽性とみなした。

2.7 免疫沈降法

主として以下の 2 通りの方法を用いた。方法 1 非特異的反応を防ぐため、20 μ l の [³⁵S] メチオニン標識ウイルス蛋白液と 100 μ l の P3-X63-Ag8-653 培養上清を室温で 1 時間反応後 50 μ l の 10% *Staphylococcus aureus* (以下 *S. aureus*; Zymed Laboratories, U. S. A.) 懸濁液 (V/V) を加えさらに 15 分反応させた。低速遠心により得られた上清に 100 μ l の各ハイブリドーマ上清を加え、1 時間室温にて反応後、60 μ l の 10% *S. aureus* 懸濁液 (V/V) を加え 15 分反応させた¹⁵⁾。方法 2 抗マウス IgG ヤギ IgG で飽和した 50% protein A-Sepharose 4B (Pharmacia) 懸濁液 50 μ l に腹水 15 μ l を加え 1 時間室温で反応させた。0.15 M NaCl 加トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) で一度洗浄後、50 μ l の [³⁵S] メチオニン標識ウイルス蛋白液を加え 1 時間室温で反応させた¹⁶⁾。

方法 1, 2 ともに、その後 2.5 M KCl, 0.15 M NaCl, 0.5% Nonidet P40 を含む 50 mM トリス-塩酸緩衝液で 1 度、0.15 M NaCl, 0.5% Nonidet P40 を含む 50 mM トリス-塩酸緩衝液で 2 度洗浄した。洗浄した *S. aureus* あるいは protein A-Sepharose 4B に 50 μ l の 2% SDS, 5% 2-メルカプトエタノール加 50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 6.8) を加え、100°C, 4 分間熱処理後、12.5% 平板 SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い免疫沈降蛋白を解析した。

2.8 遺伝子組換え体の作製

RV は分節 RNA を有しており、そのために二種の

RV を *in vitro* で混合感染すると分節 RNA の交換により比較的容易に遺伝子組換え体を得ることができる¹⁷⁾. 本研究に用いた遺伝子組換え体 C15 株は, 以下の方法で作製した¹⁸⁾. トリプシンで前処置した Wa 株 (subgroup II, serotype 1) と HN-126 株 (subgroup I, serotype 2) を, それぞれ M. O. I. 2 及び 4 p. f. u./cell で MA-104 細胞に混合感染させ, 37°C, 1 時間吸着後, 未吸着ウイルスを除き, 洗浄後トリプシン (1 µg/ml) 存在下で 37°C 48 時間培養した. 次いで, その培養上清を MA-104 細胞に接種しトリプシン (3 µg/ml) と serotype 1 特異的抗血清を含む寒天重層液の存在下で 4 日間培養した後, 二次重層を行い, 翌日出現したプラークを採取することでクローニングを行った. 得られたクローンを CV-1 細胞で増殖させ組換え体 C15 株を得た. 同様にして YO 株 (subgroup II, serotype 3) と Hochi 株 (subgroup II, serotype 4) の混合感染により C148 株を得た.

得られた遺伝子組換え体の subgroup 特異性の決定は 3 種のモノクローナル抗体 (subgroup I 特異的抗体: S2-37, subgroup II 特異的抗体: YO-5, 共通反応性抗体: YO-156) を用いる ELISA 法により, serotype 特異性の決定は, 各 serotype 特異的ポリクローナル抗体を用いた蛍光フォーカス減少法あるいはプラーク減少法により行った¹⁹⁾. RNA パターンの解析は Laemmli *et al*¹⁹⁾. の方法を一部改変したポリアクリルアミドゲル電気泳動法^{15,32)} により行った. その結果, C15 株は VP3 が Wa 株由来で VP7 が HN-126 株由来の抗原モザイクであり¹⁸⁾, 一方 C148 株は VP3 が Hochi 株由来で VP7 が YO 株由来の抗原モザイクであることが示された (浦沢ら未発表データ).

2.9 N-mAb 抵抗性変異株の作製

Serotype 1 特異的な 5 種の N-mAb (KU-2, KU-3C7, KU-4, KU-5H1 及び KU-6A11) と cross-reactive な反応を呈する 7 種の N-mAb (KU-4D7, KU-6B11, YO-1E6, YO-1S3, YO-2C2, YO-4C2 及び ST-1F2) の各抗体に抵抗性を獲得した変異株は以下の要領で作製した.

親株には, プラーク法により二度クローニングを行った KU 株を用いた. トリプシンで活性化した KU 株 (10^6 p.f.u./ml) の 10^0 , 10^1 , 10^2 あるいは 10^3 倍希釈液と腹水の 25, 100, 500 あるいは 2,000 倍希釈液を等量ずつ混和し, 37°C で 1 時間中和反応を行った. 反応液を培養チューブ (径 13 mm, 長さ 150 mm) に培養した MA-104 細胞に 1 時間吸着し, 未吸着ウイルスを洗浄除去後, 5 µg/ml のトリプシンと腹水の 100, 500 あるいは

2,000 倍希釈液を含む 1 ml の Eagle's MEM を加え, 5~7 日間回転培養 (10 回転/時) を行った. 各培養チューブの培養上清を YO-156 抗体を利用した ELISA でウイルスの増殖の度合を判定し, 中和反応に用いた抗体を利用した ELISA で各抗体に対する抵抗性を判定した. 以上の操作を再度行った後, 得られた各抗体抵抗性変異株は, CV-1 細胞を用いたプラーク法により 2 回クローニングし, 最終的に蛍光フォーカス減少法による中和反応で各抗体に対する抵抗性を確認した.

3 成 績

3.1 抗 HRV N-mAb の作製

精製濃縮した KU 株 (serotype 1), S2 株 (serotype 2), YO 株 (serotype 3) 及び ST-3 株 (serotype 4) を免疫原とし, 9 回の細胞融合実験の結果, 抗 HRV N-mAb を産生する計 22 株のハイブリドーマを作製した. これらハイブリドーマは 2 株を除きいずれも IgG 産生株であるが, IgG サブクラスは 2a, 2b 及び 3 のいずれかであり, IgG1 を産生する株はみられなかった.

樹立した各ハイブリドーマをマウス腹腔内に接種することにより得られた腹水を用いて, 4 株の serotype 1 HRV, 5 株の serotype 2 HRV, 4 株の serotype 3 HRV, 2 株の serotype 4 HRV 及び 2 株の動物 RV との反応パターンを中和反応により検討した. その結果, 22 種の抗体は, 1) serotype 特異的な反応を呈するもの (15 種) と 2) cross-reactive な反応を呈するもの (7 種) との 2 群に大別された.

3.2 N-mAb の中和反応と ELISA における反応パターン

3.2.1 serotype 特異的 N-mAb

KU 株 (serotype 1) を免疫原として得られた KU-2, KU-3C7, KU-4, KU-5H1 及び KU-6A11 の 5 種の N-mAb は serotype 1 に属する 4 種の HRV の感染性を中和した. 7 種の N-mAb (S2-2F2, S2-2F3, S2-2G10, S2-2H11, S2-3E12, S2-3H8 及び S2-4E9) は serotype 2 に属する HRV を特異的に中和したが, そのうちの 2 種の N-mAb S2-2H11 と S2-3E12 は S2, P1 株とは強い反応性を示すものの, 同じ serotype 2 に属する AK-26, DS-1, NH-126 株とはきわめて弱い反応しか示さないか, 全く反応しなかった. この結果は, serotype 2 の HRV 株間で少なくとも, S2-2H11 と S2-3E12 の反応する中和エピトープにおける抗原性が異なる株の存在を意味する. 同様にして, 2 種の N-mAb YO-1E2 と YO-1G4 は, serotype 3 に属する 3 株の HRV (YO, S3 及び P2 株) とサル由来の SA11 株を

特異的に中和するものの、ポリクローナル抗体で serotype 3 に分類されている AK-35 株を中和せず, serotype 3 HRV の株間でも抗原性の異なる株の存在が明らかとなった。ST-2G7 は serotype 4 の Hocht 株と ST-3 株を特異的に中和したが、2 株に対する中和価には 16 倍以上の相違があり、2 株間の抗原性の違いを示唆した。以上の結果を Table 1 に示す。

ELISA における各 N-mAb と 17 種の RV との反応パターンも 2 種の N-mAb を除いて中和反応でみられた反応パターンと全く同様であった (Table 2)。例外的に、S2-3H8 と S2-4E9 は中和反応における結果と異なり、serotype 2 の HRV とともに serotype 1 の KU 株及び serotype 4 の Hocht 株とも反応性を呈した。

3.2.2 cross-reactive な反応性を呈する N-mAb

複数の serotype の HRV と cross-reactive に反応する 7 種の N-mAb と 17 種の RV との中和反応の結果を Table 3 に示す。7 種の cross-reactive な N-mAb の反応パターンは大別して 1) K8 株を除くすべての HRV と反応する (KU-4D7)、2) K8 株を除く serotype 1、3 及び 4 の HRV と SA11、NCDV 株と反応する (KU-6B11)、3) K8 株を除く serotype 1、3 及び 4 の HRV と反応する (YO-1E6、YO-1S3、YO-2C2、ST-1F2) 及び 4) serotype 1、3 及び 4 の HRV と SA11 株と反応する (YO-4C2) の 4 群に分類された。興味ある結果は、KU-4D7 を除く 6 種の抗体が serotype 2 に属する HRV に対する中和能がまったくみられないか、ごく弱い程度であり、serotype 2 に属する HRV の抗原性が他の 3 種の serotype とかなり異なっていると考えられること、及び SA11 株と NCDV 株に対して中和能を示す抗体が 2 種のみであり、HRV 特有の中和エпитオプの存在が示唆されたことである。さらに YO-4C2 を除くいずれの抗体も K8 株に対し中和能を示さなかった。

ELISA における反応では、多くの cross-reactive な抗体が、中和反応における反応よりも、より広い交差性を示した (Table 4)。特に、KU-6B11、YO-1S3 及び YO-2C2 と serotype 2 HRV 株の間において、中和反応では認められなかった強い反応性が ELISA において観察された。また、YO-1E6 と YO-1S3 では SA11 株と、YO-2C2 では SA11 株及び NCDV 株との反応が中和反応では検出されないにもかかわらず、ELISA において陽性の結果を示した。さらに、中和反応ではみられない ST-1F2 と S12 株との反応性も ELISA において示された。

3.3 N-mAb の蛋白特異性

3.3.1 免疫沈降反応による検討

RV の中和に関与する抗原は、外殻蛋白である VP3 と VP7 双方に存在することが判明している。故に、得られた N-mAb がいずれの蛋白を認識するかは重要な問題であり、この点を免疫沈降反応により検討した。

材料と方法に記載した Protein A を担う *S. aureus* 菌体を用いた方法 1 の免疫沈降法によって、既に 4 種の serotype 2 特異的 N-mAb S2-2F2、S2-2F3、S2-3H8 及び S2-4E9 が、S2 株感染細胞抽出液の VP3 を特異的に沈降すること、さらに cross-reactive な 2 種の N-mAb KU-4D7 と YO-2C2 も KU 株あるいは YO 株感染細胞抽出液の VP3 を特異的に沈降することが判明している¹⁵⁾。しかしながら、他の N-mAb はいずれのウイルス蛋白をも免疫沈降しないため、protein A-Sepharose 4B (Pharmacia) を用いた方法 2 を採用したところ、cross-reactive な 5 種の N-mAb はいずれも VP3 を免疫沈降することが明らかとなった (Fig. 1)。Serotype 特異的な反応を呈する残りの 11 種の N-mAb の免疫沈降反応は、様々な反応時間、反応温度あるいは抗体濃度を設定しても成立しなかった。

3.3.2 遺伝子組換え体による検討

免疫沈降反応により蛋白特異性の決定ができない N-mAb については、異なる serotype に属する 2 種の HRV の混合感染によって行われた遺伝子組換え体の利用を試みた。

遺伝子組換え体 C15 株は Wa 株 (serotype 1) と HN-126 株 (serotype 2) との混合感染により得られた株であり、VP3 は Wa 株由来で serotype 1 特異抗原を、VP7 は HN-126 株由来で serotype 2 特異抗原をもつという抗原的にモザイクを示すウイルス株である¹⁶⁾。従って serotype 1 あるいは serotype 2 特異的な各 N-mAb の C15 株とその親株である Wa 株、HN-126 株に対する反応性を調べることで、各抗体が VP3 と VP7 のいずれの蛋白を認識するかを決定できる。

5 種の serotype 1 特異的 N-mAb (KU-2、KU-3C7、KU-4、KU-5H1 及び KU-6A11) はいずれも serotype 1 特異抗原をもつ VP3 を有する C15 株と反応しなかった (Table 5)。従ってこれらの N-mAb の蛋白特異性は VP7 であることが示された。一方 serotype 2 特異的 N-mAb S2-2G10 は C15 株を中和することから、S2-2G10 は C15 株の serotype 2 特異性を有する VP7 と反応したことを意味し、S2-2G10 の蛋白特異性は VP7 であることが示された (Table 5)。免疫沈降法で VP3 を認識することが判明している serotype 2 特異

Table 1 Reactivity patterns of serotype-specific neutralizing monoclonal antibodies against RV as determined by neutralization test.

Virus strain	Neutralizing titer*														
	KU-2 (2b)**	KU-3C7 (3)	KU-4 (3)	KU-5H1 (3)	KU-6A11 (3)	S2-2F2 (2b)	S2-2F3 (2b)	S2-2G10 (2a)	S2-2H11 (3)	S2-3E12 (3)	S2-3H8 (2b)	S2-4E9 (2a)	YO-1E2 (2b)	YO-1G4 (2b)	ST-2G7 (2a)
Serotype 1															
KU	1600	3200	≥25600	3200	≥25600	—***	—	—	—	—	—	—	—	—	—
K8	1600	1600	≥25600	400	≥25600	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S12	1600	1600	≥25600	400	≥25600	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Wa	1600	1600	≥25600	1600	≥25600	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Serotype 2															
S2	—	—	—	—	—	≥25600	≥25600	12800	12800	3200	12800	≥25600	—	—	—
AK-26	—	—	—	—	—	≥25600	≥25600	3200	400	—	≥25600	≥25600	—	—	—
P1	—	—	—	—	—	6400	≥25600	12800	1600	1600	≥25600	12800	—	—	—
DS-1	—	—	—	—	—	≥25600	≥25600	12800	—	—	12800	≥25600	—	—	—
HN-126	—	—	—	—	—	≥25600	≥25600	3200	—	—	12800	12800	—	—	—
Serotype 3															
YO	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	≥25600	≥25600	—
S3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	≥25600	≥25600	—
P2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	≥25600	≥25600	—
AK-35	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Serotype 4															
Hochi	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1600
ST-3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	≥25600
Animal RV															
SA11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	≥25600	≥25600	—
NCDV	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

* Neutralizing titer is expressed as the reciprocal of the highest dilution of ascitic fluid that reduced the fluorescent focus count by more than 60%.

** IgG isotype.

*** Neutralizing titer of <100.

Table 2 Reactivity patterns of serotype-specific neutralizing monoclonal antibodies against RV as determined by ELISA.

Virus strain	ELISA test* with													
	KU-2	KU-3C7	KU-4	KU-5H1	KU-6A11	S2-2F2	S2-2F3	S2-2G10	S2-3E12	S2-3H8	S2-4E9	YO-1E2	YO-1G4	ST-2G7
Serotype 1														
KU	1000	745	1381	459	873	70	100	116	133	1276	791	39	78	33
K8	1214	676	1064	640	985	48	40	71	89	26	56	49	37	31
S12	392	338	1013	305	787	206	70	235	152	83	139	22	48	41
Wa	1083	792	1241	782	833	164	100	57	140	201	115	41	136	49
Serotype 2														
S2	80	270	193	36	50	1021	1135	1072	688	1275	981	142	66	30
AK-26	135	148	124	90	126	852	400	952	173	726	531	66	77	93
P1	91	220	156	148	157	1117	672	1206	1028	1031	694	53	90	31
DS-1	79	118	153	59	15	1056	919	1070	75	1122	765	22	76	49
HN-126	142	199	181	91	49	1285	1233	1223	117	1301	927	107	88	66
Serotype 3														
YO	68	176	157	49	21	55	26	64	79	29	87	1251	1367	9
M-28	247	110	94	36	92	103	79	41	57	30	103	587	405	20
S3	131	28	221	119	114	176	54	146	38	32	154	749	1068	36
P2	91	131	140	58	105	222	41	164	46	76	162	933	1030	44
AK-35	194	126	82	55	185	216	38	119	94	182	118	72	41	51
Serotype 4														
Hochi	141	135	161	189	20	68	75	62	85	342	375	56	115	900
Hosokawa	275	ND	244	ND	264	188	51	120	93	84	75	69	66	1150
ST-3	62	178	167	178	95	157	70	40	52	24	129	170	109	660
Animal RV														
SA11	242	128	136	128	36	101	144	72	141	220	66	1259	1439	37
NCDV	153	84	144	84	61	84	70	158	86	157	96	64	130	7

* ELISA test was carried out by using serotype-specific N-mAb as a capture antibody. The figures in the table show the sum of OD₄₉₀X1,000 in two wells.

Values over 300 in each ELISA test were considered to show positive reaction.

Table 3 Reactivity patterns of cross-reactive monoclonal antibodies against RV as determined by neutralization test.

Virus strain	Neutralizing titer*						
	KU-4D7 (ND)**	KU-6B11 (2b)	YO-1E6 (ND)	YO-1S3 (2a)	YO-2C2 (2a)	YO-4C2 (2b)	ST-1F2 (2a) .
Serotype 1							
KU	≥25600	≥25600	6400	12800	6400	3200	12800
K8	<100	400	<100	<100	<100	3200	<100
S12	12800	≥25600	≥25600	≥25600	3200	3200	<100
Wa	≥25600	≥25600	≥25600	≥25600	6400	6400	≥25600
Serotype 2							
S2	≥25600	400	100	<100	400	400	<100
AK-26	≥25600	1600	100	<100	1600	100	400
P1	12800	<100	100	<100	<100	400	<100
DS-1	≥25600	400	400	<100	<100	<100	<100
HN-126	≥25600	400	100	<100	3200	<100	<100
Serotype 3							
YO	≥25600	≥25600	≥25600	≥25600	≥25600	≥25600	1600
M-28	6400	≥25600	ND	6400	1600	ND	6400
S3	6400	≥25600	3200	≥25600	≥25600	≥25600	1600
P2	12800	≥25600	6400	≥25600	6400	≥25600	6400
AK-35	12800	12800	6400	6400	6400	400	3200
Serotype 4							
Hochi	≥25600	12800	≥25600	6400	6400	≥25600	≥25600
ST-3	≥25600	≥25600	≥25600	≥25600	3200	6400	≥25600
Animal RV							
SA11	<100	≥25600	<100	<100	<100	≥25600	<100
NCDV	<100	≥25600	<100	<100	<100	<100	<100

* Neutralizing titer is expressed as the reciprocal of the highest dilution of ascitic fluid that reduced the fluorescent focus count by more than 60%.

** IgG isotype; IgG isotypes of KU-4D7 and YO-1E6 were not determined.

Table 4 Reactivity patterns of cross-reactive neutralizing monoclonal antibodies against RV as determined by ELISA.

Virus strain	ELISA test* with						
	KU-4D7	KU-6B11	YO-1E6	YO-1S3	YO-2C2	YO-4C2	ST-1F2
Serotype 1							
KU	1000	1075	1315	1121	1073	1322	1193
K8	29	53	13	83	130	319	54
S12	440	881	812	1051	675	1096	552
Wa	737	1119	1238	792	1058	1324	844
Serotype 2							
S2	1105	988	147	844	1090	140	37
AK-26	830	346	80	560	733	190	53
P1	946	662	119	827	901	68	62
DS-1	985	813	228	866	1095	125	38
HN-126	934	1072	62	1163	1237	127	122
Serotype 3							
YO	1141	1087	1162	1242	1215	1338	1194
M-28	732	798	760	655	1112	1115	711
S3	512	670	478	591	714	922	600
P2	881	999	437	865	1011	1000	972
AK-35	1010	1069	1288	1055	1029	1364	1162
Serotype 4							
Hochi	748	1044	1284	1159	1105	1334	1204
Hosokawa	695	1095	992	1044	1023	1282	1102
ST-3	406	652	776	946	989	845	817
Animal RV							
SA11	59	1287	1243	1337	431	1357	81
NCDV	106	1026	62	41	667	71	147

* ELISA test was carried out by using cross-reactive N-mAb as a capture antibody. The figures in the table show the sum of OD₄₁₀X 1,000 in two wells. Values over 300 in each ELISA test were considered to show positive reaction.

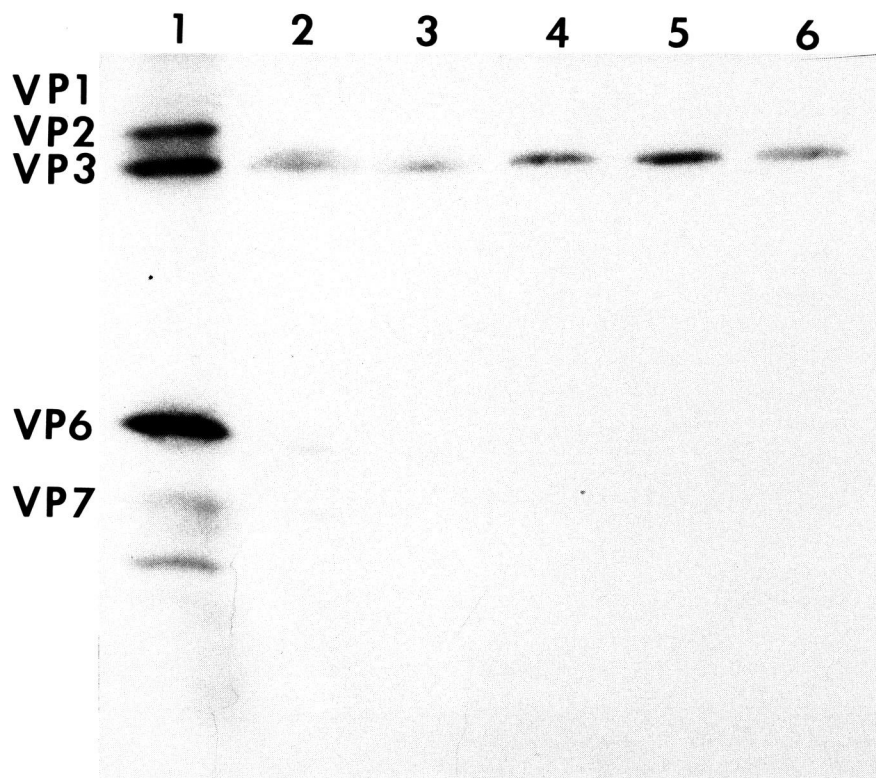


Fig. 1 Immunoprecipitation of HRV (KU strain) proteins from [35 S] methionine-labeled infected lysate by monoclonal antibodies. Lane 1, anti-KU mouse serum; lane 2, KU-6B11 antibody; lane 3, YO-1S3 antibody; lane 4, YO-1E6 antibody; lane 5, YO-4C2 antibody; lane 6, ST-1F2 antibody. Viral proteins are designated according to Estes *et al.*¹⁾

Table 5 Protein specificity of neutralizing monoclonal antibodies as determined by their reactivities with reassortant C15.

Hybridoma	Neutralizing titer*			Protein specificity
	Wa (serotype 1)	HN-126 (serotype 2)	C15** (reassortant)	
serotype 1-specific				
KU-2	1600	<100	<100	VP7
KU-3C7	1600	<100	<100	VP7
KU-4	≥25600	<100	<100	VP7
KU-5H1	1600	<100	<100	VP7
KU-6A11	≥25600	<100	<100	VP7
serotype 2-specific				
S2-2F2	<100	≥25600	<100	VP3
S2-2G10	<100	6400	6400	VP7
S2-4E9	<100	6400	<100	VP3

* Neutralizing titer is expressed as the reciprocal of the highest dilution of ascitic fluid that reduced the fluorescent focus count by more than 60%.

** C15 strain has serotype 1 (Wa) specificity on VP3 and serotype 2 (HN-126) specificity on VP7¹⁸⁾.

的な S2-2F2 及び S2-4E9 は C15 株と反応せず、確かにこれら 2 種の N-mAb の蛋白特異性が VP3 であることが確認できた。

同様に、serotype 3 あるいは serotype 4 特異的な 3 種の N-mAb の蛋白特異性は YO 株 (serotype 3) と Hocht 株 (serotype 4) との混合感染によって得られた遺伝子組換え体 C148 株を利用して決定された。C148 株は VP3 が Hocht 株由来で serotype 4 特異性を、VP7 が YO 株由来で、serotype 3 特異性を有する。Serotype 3 特異的な YO-1E2 及び YO-1G4 は、serotype 3 特異抗原をもつ VP7 を有する C148 株を中和することから、その蛋白特異性は VP7 であることが判明した。Serotype 4 特異的な ST-2G7 は C148 株を中和しないことから、その蛋白特異性は VP7 であると決定された (Table 6)。

3.4 N-mAb に抵抗性を獲得した変異株を利用した中和エピトープの解析

ここで用いる中和エピトープと抗原部位という用語については、エピトープとは、個々の抗体が認識し結

合する個々のアミノ酸配列 (隣接するしないにかかわらず) のコンホメーションを指し、抗原部位とは、個々のエピトープあるいは複数のエピトープ群の、トポロジカルに部分的にでも重複しない領域を指し、一般に競合試験や抵抗性変異株を用いた解析で規定されるものと定義することにする^{23,24}。

3.4.1 serotype 1 特異的 N-mAb の認識するエピトープ

VP7 に結合する 5 種の serotype 1 特異的 N-mAb (KU-2, KU-3C7, KU-4, KU-5H1 及び KU-6A11) を用いて、KU-2 抵抗性変異株を除く 4 種の変異株 (V-KU-3C7, V-KU-4, V-KU-5H1 及び V-KU-6A11) を得た。得られた 4 種の変異株に対する 5 種の serotype 1 特異的 N-mAb の反応性を蛍光フォーカス減少法による中和試験で検討した。Table 7 に示されるように KU-3C7 は本抗体を用いて作製された抵抗性変異株 V-KU-3C7 のほか、KU-5H1 及び KU-6A11 に対する抵抗性変異株 V-KU-5H1 及び V-KU-6A11 との反応性を全くまたはほとんど消失し

Table 6 Protein specificity of neutralizing monoclonal antibodies as determined by their reactivities with reassortant C148.

Hybridoma	Neutralizing titer*			Protein specificity
	YO (serotype 3)	Hochi (serotype 4)	C148** (reassortant)	
serotype 3-specific				
YO-1E2	≥25600	<100	6400	VP7
YO-1G4	≥25600	<100	3200	VP7
serotype 4-specific				
ST-2G7	<100	≥25600	<100	VP7

* Neutralizing titer is expressed as the reciprocal of the highest dilution of ascitic fluid that reduced the fluorescent focus count by more than 60%.

** C148 strain has serotype 4 (Hocht) specificity on VP3 and serotype 3 (YO) specificity on VP7.

Table 7 Epitope analysis of antigenic variants (KU strain) selected with serotype 1-specific neutralizing monoclonal antibodies as determined by neutralization test.

antigenic variant	Neutralizing titer*				
	KU-2	KU-3C7	KU-4	KU-5H1	KU-6A11
V-KU-3C7	<100	<100	≥25600	<100	<100
V-KU-4	1600	3200	<100	1600	<100
V-KU-5H1	1600	100	1600	<100	<100
V-KU-6A11	3200	<100	<100	<100	<100
parent virus (KU)	1600	3200	≥25600	3200	≥25600

* Neutralizing titer is expressed as the reciprocal of the highest dilution of ascitic fluid that reduced the fluorescent focus count by more than 60%.

ている。この成績は、KU-3C7 の認識する中和エпитープ(KU-3C7 エピトープ；以下同様の命名)が KU-5H1 及び KU-6A11 エピトープと少なくとも部分的に重なり合っていることを示唆していると考えられる。同様に KU-4 エピトープは KU-6A11 エピトープと、KU-5H1 エピトープは KU-3C7 及び KU-6A11 エピトープと、KU-6A11 エピトープは KU-3C7、KU-4 及び KU-5H1 エピトープと部分的に重なり合うことが示唆される。また KU-2 抗体に対する抵抗性変異株は作製し得なかったが、他の変異株との反応性から KU-2 エピトープと KU-3C7 エピトープとの部分的重複が推定される。以上の結果から、5 種の serotype 1 特異的 N-mAb の認識する VP7 上の 5 種の中和エピトープは機能的に互いに異なるものの、部分的に重なり合う 1 つ

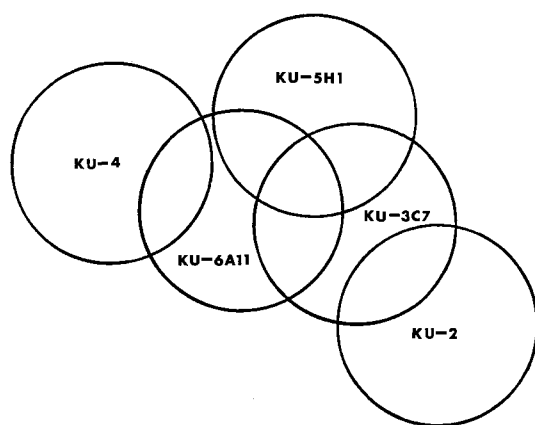


Fig. 2 Operational map of serotype 1-specific neutralization epitopes on VP7. The circles represent the five epitopes delineated by N-mAbs KU-2, KU-3C7, KU-4, KU-5H1 and KU-6A11.

の抗原部位としてのまとまりを有すると考えられる。Fig. 2 に推定される各エピトープの相互関係を示した。

3.4.2 cross-reactive N-mAb の認識する中和エピトープ

VP3 に結合する 7 種の cross-reactive N-mAb のそれぞれに抵抗性の変異株 7 株を得た。これらの変異株に対する 7 種の cross-reactive N-mAb の反応性を中和試験で検討した結果、KU-4D7、YO-2C2 及び YO-4C2 はそれぞれ V-KU-4D7、V-YO-2C2 及び V-YO-4C2 のみに対して中和能を失っていた。一方、KU-6B11、YO-1E6、YO-1S3 及び ST-1F2 は、ともに V-KU-4D7、V-YO-2C2 及び V-YO-4C2 を中和したが、V-KU-6B11、V-YO-1E6、V-YO-1S3 及び V-ST-1F2 に対する反応性を全くまたはほとんど消失していた (Table 8)。従って 1) KU-4D7 エピトープ、YO-2C2 エピトープ及び YO-4C2 エピトープは他のエピトープと機能的に重なり合うことなくそれぞれ独立して存在すること、2) KU-6B11 エピトープ、YO-1E6 エピトープ、YO-1S3 エピトープ及び ST-1F2 エピトープは機能的に重なり合い、1 つの中和エピトープ群としてのまとまりを有すると考えられ、VP3 上の cross-reactive な抗原部位には、少なくとも明確に区別される 4 種の中和エピトープが存在することが示唆された。

4 考 察

RV の抗原は、主として群特異抗原、subgroup 特異抗原、serotype 特異抗原により構成されている。群特異抗原は、二重殻構造をなす RV 粒子の内殻蛋白 VP6 に存在し、現在までに A~E 群が報告されている²⁵⁾。

Table 8 Epitope analysis of antigenic variants (KU strain) selected with cross-reactive neutralizing monoclonal antibodies as determined by neutralization test.

antigenic variant	Neutralizing titer*						
	KU-4D7	KU-6B11	YO-1E6	YO-1S3	YO-2C2	YO-4C2	ST-1F2
V-KU-4D7	<100	12800	1600	3200	≥25600	1600	6400
V-KU-6B11	3200	100	<100	<100	≥25600	1600	<100
V-YO-1E6	3200	100	<100	<100	≥25600	3200	<100
V-YO-1S3	6400	100	100	<100	≥25600	3200	<100
V-YO-2C2	3200	6400	1600	12800	<100	1600	3200
V-YO-4C2	3200	6400	1600	3200	6400	<100	1600
V-ST-1F2	6400	400	100	<100	≥25600	1600	<100
parent virus (KU)	6400	12800	6400	12800	12800	3200	6400

* Neutralizing titer is expressed as the reciprocal of the highest dilution of ascitic fluid that reduced the fluorescent focus count by more than 60%.

RVの大部分はA群に属し、B～E群はRNAパターンがA群RVとはかなり異っており、“atypical rotavirus”あるいは“pararotavirus”と呼ばれ、きわめて低頻度にしか検出されていない²⁾。従って本論文ではA群RVについてのみ言及する。

Subgroup 抗原は、中和反応以外の血清反応、すなわちCF, IEM, ELISA, IAHA, RIAなどにより検出され、少なくとも2種のsubgroup 特異性(subgroup I及びsubgroup II)が知られている。Subgroup 特異性は群特異抗原と同様内殻蛋白VP6によって規定される⁶⁾が、別の内殻蛋白VP2にもsubgroup 特異性を規定する抗原の存在が報告されている¹⁴⁾。

Serotype 抗原は、中和反応によって検出され、主として外層糖蛋白VP7によって規定される。多数のRVとRVに対するポリクローナルな抗血清を用いた交差中和試験により、現在までにヒトでは4種(serotype 1～4)、その他の動物を含めると少なくとも7種の異なるserotypeが報告されている²⁶⁾。Serotype 1及びserotype 2はヒトからのみ分離されているが、serotype 3及び4 RVでは、動物種の境を越えて、ヒト及び複数の動物種から分離されており、例えばサル由来のSA11株はserotype 3に属する。

著者らは、serotype 1, 2, 3あるいは4に属するHRVのそれぞれに特異的に反応するN-mAbを作製した。これら抗体の蛋白特異性を検討した結果、serotype 1特異的N-mAb (KU-2, KU-3C7, KU-4, KU-5H1, 及びKU-6A11), serotype 3特異的N-mAb (YO-1E2及びYO-1G4), serotype 4特異的N-mAb (ST-2G7)は全てVP7を認識することが、そしてserotype 2特異的N-mAbのうちS2-2G10がVP7を、S2-2F2, S2-2F3, S2-3H8及びS2-4E9はVP3を認識することが明らかとなった。この結果は、serotype 特異抗原が、VP3にも存在することを意味する。

Hoshino *et al.*²¹⁾ は最近VP3がserotype 1特異性を、VP7がserotype 4特異性を有する野生株M37を分離している。またUrasawa *et al.* は、本研究に使用したC15株¹⁸⁾ (VP3: serotype 1, VP7: serotype 2) 及びC148株 (VP3: serotype 4, VP7: serotype 3) (浦沢ら未発表データ) という、VP3とVP7のserotype 特異性が互いに異なる遺伝子組換え体を、*in vitro*における混合感染で分離した。これらの成績から、RVにおいてserotype 特異性を担う抗原がVP3及び、VP7に独立して存在することが理解される。従って、インフルエンザウイルスにおいて、2種のウイルス蛋白ヘマグルチニンとノイラミニダーゼの抗原

型を同時に記載しているように、RVにおいてもVP3及びVP7双方のserotypeを記載する方式を採用すべきであるとの提案もなされている²¹⁾。

Serotype 特異性が互いに異なるVP3とVP7を有するRVはきわめて稀であるが、今後さらに多数のウイルス株のVP3及びVP7におけるserotype 特異性を調査する必要がある。そのためには、時間のかかる培養細胞への馴化を待たずに、便中のウイルスを用いて直接serotypingすることが要求される。著者らは、作製したserotype 特異的なN-mAbのうち、VP7を認識するKU-4, S2-2G10, YO-1E2及びST-2G7(それぞれserotype 1, 2, 3及び4に特異的なN-mAb)を用いて、ELISAによって10%糞便懸濁液中のHRVのserotypeを決定する方法を開発した。その有用性はHRV陽性糞便検体を用いて確認された(谷口ら未発表データ)。VP3を認識するserotype 特異的N-mAbは、serotype 2に対してのみしか得られていないが、serotype 1, 3及び4に特異的な抗VP3 N-mAbが用意されれば、ELISAにより多数のHRVのVP3, VP7双方のserotype 特異性の決定が可能となり、HRVの疫学・生態学を研究する上で大きく寄与することになるであろう。

各serotype内のウイルス株間において抗原性に違いが存在することは、すでにポリクローナル抗体を用いた交差試験の結果から示唆されていたが^{13,27)}、本研究におけるN-mAbを用いた中和反応及びELISAの結果はそれを立証したと言える。S2-2H11, S2-3E12はserotype 2 HRVのS2, P1株とのみ反応し、AK-26, DS-1及びHN-126株とは反応せず、serotype 2に属すHRVに抗原性の異なる株が存在することを示す。また、YO-1E2, YO-1G4はserotype 3に属するAK-35株と反応しなかったことから、AK-35株はserotype 3 HRVの抗原変異株であると言える。AK-35株はアフリカで分離された株であり、地理的に離れた地域での抗原変異の存在が示唆される(浦沢ら未発表データ)。こうした同一serotype内における株間の抗原性の違いは、mAbを用いて検出される場合が多く、インフルエンザウイルス²⁸⁾、狂犬病ウイルス²⁹⁾、ポリオウイルス³⁰⁾、RSウイルス³¹⁾その他で報告されている。さらに多くのRV株を用いて、各N-mAbとの反応性を検討することで、同一serotype内での株による中和抗原の違いがより明瞭に把握されるであろう。またAK-35株のような変異株を免疫原としてN-mAbを作製することも、抗原変異部位の解析に有用であろう。

一方、cross-reactiveな中和エピトープにおける変異

も検出された。特に serotype 1 に属する K8 株は YO-4C2 を除く他の 6 種の cross-reactive N-mAb と反応性を呈さず、この株の cross-reactive な中和エпитーブはかなり変異を起していると推測される。興味深いのは K8 株の RNA パターンが A 群の RV にみられる典型的なパターンとやや異なっていること³²⁾、そして K8 株が subgroup II に属しているにもかかわらず、subgroup II 特異的な抗 VP2 subgroup II 特異的 mAb YO-60 との反応性も失っている点である¹⁴⁾。K8 株は、1977 年北見市で発生した下痢集団発生での 14 歳の年長児より分離された株¹³⁾であり、乳幼児から分離される多くの株とは異なり抗原的にかなり変化した株と思われる。他に S12 株、AK-35 株についても、それぞれ ST-1F2、YO-4C2 の認識する中和エпитーブにおける変異が中和試験でのみ検出された。さらに、SA11 株が YO-1E6、YO-1S3、YO-2C2 と、NCDV 株が YO-2C2 と中和反応は呈さないが、ELISA では反応した。このような結果は、従来ヘルペスウイルス中和抗体における補体要求性中和抗体などから推定されている、ウイルス中和反応における 2 相性の考え方³³⁾を支持するものと考えられる。すなわち、特定の中和エпитーブにおいては、抗体はエпитーブと結合はするものの、その結合力は充分でなく（抗原-抗体反応におけるいわゆる鍵-鍵穴の fitness が充分でない）中和するに到らないものと解釈される。

Serotype 間での抗原性の違いについては、著者らの得た 7 種の cross-reactive N-mAb のうち、中和反応では 6 種の抗体が、ELISA では 3 種の抗体が、serotype 2 HRV とはきわめて弱い反応しか示さないか、あるいは全く反応しなかった。また serotype 2 の S2 株を免疫原とした融合実験では、一次スクリーニングの段階でも cross-reactive N-mAb の産生が認められなかった。さらにポリクローナルな抗 serotype 2 HRV 抗血清も serotype 1、3 及び 4 に対する中和能がほとんどない²⁷⁾。こうした結果から、serotype 2 HRV の抗原性、免疫原性が serotype 1、3 及び 4 HRV とかなり異なっていると解釈される。

ある serotype の RV の接種あるいは感染を受けた動物やヒトの血中に、異なる serotype の RV に対する抗体いわゆる cross-reactive な中和抗体が出現することが報告されている³⁴⁻³⁶⁾。しかも、そうした cross-reactive な抗体が、生体内において、接種されたあるいは感染した RV の serotype と違う serotype のウイルスの攻撃を受けた際に、防御能を示す、すなわち heterologous cross-protection が成立すると成績がいくつか

提出されている^{34,35,37,38)}。しかし、他方 cross-protection は成立しないとする報告^{36,39)}もあり、いまだに結論は下されていない。

cross-protection が成立するか否かという問題には、ウイルスの接種経路、接種量、ウイルスの serotype、動物種、接種後の経過時間、過去のウイルス抗原に対する暴露の有無など多数の因子が関与していることが考えられる⁴⁰⁾。さらに、cross-protection（あるいは、cross-neutralization）が抗体の作用ではなく、血中の非特異的インヒビター（プロテアーゼインヒビターも含む）の作用であるとの考え方もある⁴¹⁾。

本研究において、cross-reactive N-mAb が多数得られたことは、RV には確かに cross-reactive な中和エпитーブが存在することを実証したと言える。またこれらの抗体がいずれも VP3 に結合すること、しかも中和エпитーブが少なくとも 4 種存在することを明らかにしたことは、RV における cross-reactivity の分子的基盤をはじめて与えたことになる。最近 Offit *et al.*⁴²⁾は、serotype 5 のブタ RV (OSU 株) を免疫原として作製した VP3 に対する N-mAb が、serotype 3 の SA11 株、serotype 6 の UK 株に対して、cross-protection 能を有することを報告している。RV をトリプシン処理すると VP3 は VP5 (60K) と VP8 (28K) に解裂し感染性が顕著に増大する^{43,44)}。またマウスを用いた接種実験で、VP3 が病原性にきわめて密接に関連した蛋白であることが証明されている⁴⁵⁾。こうした背景から、ワクチン開発研究の基盤として VP3 の詳細な抗原構造を明らかにする必要に迫られている。今後、われわれの調整した各 cross-reactive N-mAb に抵抗性の変異株の塩基配列を決定することによって、VP3 における cross-reactive な中和エпитーブの所在と構造を詳細に検討する予定である。将来的には、VP3 上の cross-reactive 中和エпитーブに相応する合成ペプチドワクチンへの道が拓ける可能性もある。

主として HRV 感染に起因している乳幼児下痢症は、特に開発途上国においては低栄養による増悪を伴い主要な死因となっており、年間 500 万～1,000 万人もの死亡が推定されている²⁾。先進国においては、重篤になる例は稀であるが、冬期間の乳幼児下痢症入院患者の 60%～90% が HRV 感染によると報告されている²⁾。こうした背景のもと、ウイルス下痢症の根絶をめざしワクチンの開発に向け、種々のアプローチがなされており、1) HRV (Wa 株: serotype 1) あるいは動物 RV (NCDV 株: serotype 6, MMU 18006 株: serotype 3) の生ワクチン⁴⁶⁾、2) VP7 をコードする遺伝子のみ

HRV 由来の遺伝子組換え体の生ワクチン⁴⁷⁾, 3) VP7 に対する cDNA を挿入した大腸菌あるいはワクシニアウイルスの利用, そして 4) 合成ペプチドワクチンなどが検討され, その一部はすでに臨床試験が進行している. しかしながら, HRV の抗原構造の解析は決して十分とは言えず今後の研究に待つ所が多い. HRV の各 serotype の分離頻度の決定, serotype 1~4 以外の serotype の存在, heterotypic immunity 及び cross-protection の成立の可否, こういった諸問題に対し, 著者らの作製した各種の N-mAb が有用となるであろう.

5 結 論

異なる serotype に属する 4 種のヒトロタウイルスを免疫原として, 22 株の中和モノクローナル抗体 (N-mAb) 産生ハイブリドーマを樹立した. 各 N-mAb と種々のロタウイルスとの反応パターンを中和試験と酵素抗体法により検討し, 各 N-mAb の蛋白特異性を免疫沈降法と遺伝子組換え体を利用して決定した. さらに, 各 N-mAb に対し抵抗性を獲得した変異株を作製し, その抗原性の解析を行い, 以下の結果を得た.

1) 22 種の N-mAb のうち, 5 種が serotype 1 特異的, 7 種が serotype 2 特異的, 2 種が serotype 3 特異的, そして 1 種が serotype 4 特異的な反応パターンを呈した. 残りの 7 種は cross-reactive な反応性を示した.

2) 各 serotype に属するヒトロタウイルス株中に, 抗原性の異なる株の存在が明らかとなった. また serotype 2 と他の serotype の間には, 顕著な抗原性の相違が示された.

3) serotype 特異抗原は外殻蛋白の VP3 あるいは VP7 に, cross-reactive な抗原は VP3 に存在することが判明した.

4) VP7 上の serotype 1 特異的中和エпитープは少なくとも 5 種存在するが, それらは 1 つの抗原部位にまとまった.

5) VP3 上の cross-reactive な中和エпитープは少なくとも 4 種独立して存在することが示された.

謝 辞

本研究に対して, 御指導・御協力を賜りました, 札幌医科大学小児科学講座千葉峻三助教授, 並びに浦沢价子札幌医科大学衛生短期大学部教授に心より, 感謝申し上げます.

稿を終えるにあたり, 御指導・御校閲をいただきました中尾亨教授, 浦沢正三教授に深謝いたします.

文 献

1. Estes, M. K., Palmer, E. L. and Obijeski, J. F.: Rotaviruses: a review. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **105**, 123-184 (1983).
2. Kapikian, A. Z. and Chanock, R. M.: Rotaviruses, In: Fields, B. N., Knipe, D. M., Chanock, R. M., Melnick, J. L., Roizman, R. and Shope, R. E.: *Virology*, 863-906, Raven Press, New York (1985).
3. Zissis, G. and Lambert, J. P.: Different serotypes of human rotavirus. *Lancet* **1**, 38-39 (1978).
4. Zissis, G. and Lambert, J. P.: Enzyme-linked immunosorbent assays adapted for serotyping of human rotavirus strains. *J. Clin. Microbiol.* **11**, 1-5 (1980).
5. Kapikian, A. Z., Cline, W. N., Greenberg, H. B., Wyatt, R. G., Klica, A. R., Banks, C. E., James, H. D., Jr., Flores, J. and Chanock, R. M.: Antigenic characterization of human and animal rotaviruses by immune adherence hemagglutination assay (IAHA): evidence for distinctness of IAHA and neutralization antigens. *Infect. Immun.* **33**, 415-425 (1981).
6. Kalica, A. R., Greenberg, H. B., Wyatt, R. G., Flores, J., Sereno, M. M., Kapikian, A. Z. and Chanock, R. M.: Genes of human (strain Wa) and bovine (strain UK) rotaviruses that code for neutralization and subgroup antigens. *Virology* **112**, 385-390 (1981).
7. Greenberg, H. B., Flores, J., Kalica, A. R., Wyatt, R. G., and Jones, R.: Gene coding assignments for growth restriction, neutralization and subgroup specificities of the W and DS-1 strains of human rotavirus. *J. Gen. Virol.* **64**, 313-320 (1983).
8. Smith, L. M., Lazdins, I. and Holmes, I. H.: Coding assignments of SA11 rotavirus established by *in vitro* translation. *J. Virol.* **33**, 976-982 (1982).
9. MacCrae, M. A., and McCorquodale, J. G.: The molecular biology of rotaviruses. II. Identification of the protein-coding assignments of calf rotavirus genome RNA species. *Virology* **117**, 435-443 (1982).
10. Sato, K., Inaba, Y., Shinozaki, T., Fujii, R. and Matumoto, M.: Isolation of human rotavirus in cell cultures. *Arch. Virol.* **69**, 155-160 (1981).
11. Urasawa, T., Urasawa, S. and Taniguchi, K.: Sequential passages of human rotavirus in MA-104 cells. *Microbiol. Immunol.* **25**, 1025-1035 (1981).

12. Wyatt, R. G., James, H. D., Jr., Pittman, A. L., Hoshino, Y., Greenberg, H. B., Kalica, A. R., Flores, J. and Kapikian, A. Z.: Direct isolation in cell culture of human rotaviruses and characterization into four serotypes. *J. Clin. Microbiol.* **18**, 310-317 (1983).
13. Urasawa, S., Urasawa, T., Taniguchi, K. and Chiba, S.: Serotype determination of human rotavirus isolates and antibody prevalence in pediatric population in Hokkaido, Japan. *Arch. Virol.* **81**, 1-12 (1984).
14. Taniguchi, K., Urasawa, T. and Urasawa, S.: Reactivity patterns to human rotavirus strains of a monoclonal antibody against VP2, a component of the inner capsid of rotavirus. *Arch. Virol.* **87**, 135-141 (1986).
15. Taniguchi, K., Urasawa, S. and Urasawa, T.: Preparation and characterization of neutralizing monoclonal antibodies with different reactivity patterns to human rotaviruses. *J. Gen. Virol.* **66**, 1045-1053 (1985).
16. Webster, R. G., Brown, L. E. and Jackson, D. C.: Changes in the antigenicity of the hemagglutinin molecule of H3 influenza virus at acid pH. *Virology* **126**, 587-599 (1983).
17. Greenberg, H. B., Kalica, A. R., Wyatt, R. G., Jones, R. W., Kapikian, A. Z. and Chanock, R. M.: Rescue of noncultivable human rotavirus by gene reassortment during mixed infection with its mutants of a cultivable bovine rotavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 420-424 (1981).
18. Urasawa, S., Urasawa, T. and Taniguchi, K.: Genetic reassortment between two human rotaviruses having different serotype and subgroup specificities. *J. Gen. Virol.* **67**, 1551-1559 (1986).
19. Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
20. Greenberg, H. B., Valdesuso, J., van Wyke, K., Midthun, K., Walsh, M., McAuliffe, V., Wyatt, R. G., Kalica, A. R., Flores, J. and Hoshino, Y.: Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus. *J. Virol.* **47**, 267-275 (1983).
21. Hoshino, Y., Sereno, M. M., Midthun, K., Flores, J., Kapikian, A. Z. and Chanock, R. M.: Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 8701-8704 (1985).
22. Offit, P. A. and Blavat, G.: Identification of two rotavirus genes determining neutralization specificities. *J. Virol.* **57**, 376-378 (1986).
23. Yewdell, J. W. and Gerhard, W.: Antigenic characterization of viruses by monoclonal antibodies. *Ann. Rev. Microbiol.* **35**, 185-206 (1981).
24. Wimmer, E., Jameson, B. A. and Emini, E. A.: Poliovirus antigenic sites and vaccines. *Nature* **308**, 19 (1984).
25. Pedley, S., Bridger, J. C., Chasey, D. and McCrae, M. A.: Definition of two new groups of atypical rotaviruses. *J. Gen. Virol.* **67**, 131-137 (1986).
26. Hoshino, Y., Wyatt, R. G., Greenberg, H. B., Flores, J. and Kapikian, A. Z.: Serotypic similarity and diversity of rotaviruses of mammalian and avian origin as studies by plaque reduction neutralization. *J. Infect. Dis.* **149**, 694-702 (1984).
27. Urasawa, S., Urasawa, T. and Taniguchi, K.: Three human rotavirus serotypes demonstrated by plaque neutralization of isolated strains. *Infect. Immun.* **38**, 781-784 (1982).
28. Gerhard, W.: The analysis of the monoclonal immune response to influenza virus. II. The antigenicity of the viral hemagglutinin. *J. Exp. Med.* **144**, 985-995 (1976).
29. Wiktor, T. J. and Koprowski, H.: Antigenic variants of rabies virus. *J. Exp. Med.* **152**, 99-112 (1980).
30. Ferguson, M., Yi-Hua, Q., Minor, P. D., Magrath, D. I., Spitz, M. and Schild, G. C.: Monoclonal antibodies specific for the Sabin vaccine strain of polio virus 3. *Lancet* **2**, 122-124 (1982).
31. Anderson, L. J., Hierholzer, J. C., Tsou, C., Hendry, R. M., Fernie, B. F., Stone, Y. and McIntosh, K.: Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J. Infect. Dis.* **151**, 626-633 (1985).
32. Taniguchi, K., Urasawa, S. and Urasawa, T.: Electrophoretic analysis of RNA segments of human rotaviruses cultivated in cell culture. *J. Gen. Virol.* **60**, 171-175 (1982).
33. 吉野亀三郎: ウイルス中和抗体とその作用機構. 蛋白質・核酸・酵素 **19**, 956-964 (1974).
34. Wyatt, R. G., Kapikian, A. Z. and Mebus, C. A.: Induction of cross-reactive serum neutralizing antibody to human rotavirus in calves after in utero administration of bovine rotavirus. *J. Clin. Microbiol.* **18**, 505-508 (1983).

35. Bishop, R. F., Barnes, G. L., Cipriani, E. and Lund, J. S.: Clinical immunity after neonatal rotavirus infection. A protective longitudinal study in young children. *N. Engl. J. Med.* **309**, 72-76 (1983).
36. Woode, G. N., Kelso, N. E., Simpson, T. F., Gaul, S. K., Evans, L. E. and Babiuk, K.: Antigenic relationships and cross-protection among some bovine rotavirus: serum neutralization and cross-protection in gnotobiotic calves. *J. Clin. Microbiol.* **18**, 358-364 (1983).
37. Vesikali, T., Isolauri, E., D'Hondt, E., Delem, A., Andre, F. E. and Zissis, G.: Protection of infants against rotavirus diarrhoea by RIT 4237 attenuated bovine rotavirus strain vaccine. *Lancet* **1**, 977-981 (1984).
38. Zissis, G., Lambert, J. P., Marbehant, P., Marissens, D., Lobmann, M., Charlier, P., Delem, A. and Zygraich, N.: Protection studies in colostrum-deprived piglets of a bovine rotavirus vaccine candidate using human rotavirus strains for challenge. *J. Infect. Dis.* **148**, 1061-1068 (1983).
39. Gaul, S. K., Simpson, T. F., Woode, G. N. and Fulton, R. W.: Antigenic relationships among some animal rotaviruses: virus neutralization *in vitro* and cross-protection in piglets. *J. Clin. Microbiol.* **16**, 495-503 (1982).
40. Offit, P. A. and Clark, H. F.: Maternal antibody-mediated protection against gastroenteritis due to rotavirus newborn mice is dependent on both serotype and titer of antibody. *J. Infect. Dis.* **152**, 1152-1158 (1985).
41. Graham, D. Y. and Estes, M. K.: Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: biological mechanisms. *Virology* **101**, 432-439 (1980).
42. Offit, P. A., Shaw, R. D. and Greenberg, H. B.: Passive protection against rotavirus-induced diarrhea by monolonal antibodies to surface proteins VP3 and VP7. *J. Virol.* **58**, 700-703 (1986).
43. Estes, M. K., Graham, D. Y. and Mason, B. B.: Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *J. Virol.* **39**, 879-888 (1981).
44. Espejo, R. T., Lopez, S. and Arias, C.: Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J. Virol.* **37**, 156-160 (1981).
45. Offit, P. A., Blavat, G., Greenberg, H. B. and Clark, H. F.: Molecular basis of rotavirus virulence: role of gene segment 4. *J. Virol.* **57**, 46-49 (1986).
46. Vesikali, T., Kapikian, A. Z., Delem, A. and Zissis, G.: A comparative trial of rhesus monkey (RRV-1) and bovine (RIT 4237) oral rotavirus vaccine in young children. *J. Infect. Dis.* **153**, 832-839 (1986).
47. Midthun, K., Greenberg, H. B., Hoshino, Y., Kapikian, A. Z., Wyatt, R. G. and Chanock, R. M.: Reassortant rotaviruses as potential live rotavirus vaccine candidates. *J. Virol.* **53**, 949-954 (1985).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学小児科学講座 森田泰行